
ABSTRACT

The PhD thesis, titled " THE DISTRIBUTION OF NEUROTROPHINS AND THEIR SPECIFIC RECEPTORS IN THE BRAIN OF ADULT ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) AND THEIR DYNAMICS UNDER THE INFLUENCE OF SOME PESTICIDES" was elaborated according to the methodological standards for doctoral theses, comprising two parts: the first summarizes the current research status by reviewing specialized literature within the thesis topic, followed by the second part, which presents the results derived from original research on the studied subject.

For the preparation of this thesis, 571 bibliographic sources from both national and international specialized literature were consulted, with the data supported by 95 figures and 6 tables.

The first part of the thesis includes three chapters: a chapter describing the biology and natural habitat of zebrafish, as well as its research applications; a chapter detailing neurotrophins and their specific receptors at the molecular level; and a chapter addressing general considerations regarding pesticides.

Neurotrophins (NTs), including nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin-4/5 (NT-4/5), along with their specific receptors (TrkA, TrkB, TrkC, and p75NTR), play essential roles in neuronal survival, development, plasticity, and function. As elaborated in Chapter 2 (Neurotrophins), these molecules are fundamental in modulating neural circuitry and maintaining brain integrity. Disruptions or imbalances in neurotrophin signaling pathways have been extensively linked to numerous neurological and neurodegenerative conditions, highlighting the need for detailed studies into their regulation, particularly under stressors such as environmental toxins.

Zebrafish (*Danio rerio*) have emerged as a powerful model for investigating neurotoxicological mechanisms due to their genetic, physiological, and developmental similarities to humans, as thoroughly described in Chapter 1, "Zebrafish as a Model

Adriana Petrovici

Organism." Their transparency at embryonic stages, rapid lifecycle, and clear anatomical delineation offer distinct advantages for precise experimental interventions and detailed observational analyses.

The widespread use of pesticides such as deltamethrin (DM), imidacloprid (IMI), and fipronil (FIP), documented comprehensively in Chapter 3 (Pesticides), raises significant concerns regarding their potential adverse neurological effects. Although individual pesticide toxicity profiles are somewhat understood, the combined or mixed exposures represent a significant knowledge gap. This research, as systematically described in Chapter 4 (Experimental Design), specifically aimed to investigate how chronic and subchronic exposure to these pesticides, both individually and in combination, influence the distribution and expression dynamics of neurotrophins and their receptors in the adult zebrafish brain.

Detailed baseline anatomical and histological characterizations were first established in Subchapter 5.1 (Adult zebrafish brain anatomy and histology), providing crucial reference points for interpreting observed pathological alterations. Furthermore, the baseline expression and precise anatomical localization of neurotrophins and their receptors in the zebrafish brain and retina were meticulously documented through advanced in situ hybridization methods, as detailed in Subchapter 5.2.

The experimental results were systematically documented in Chapter 5. Subchapter 5.3 (Brain histopathological assessment of zebrafish subchronically exposed to single pesticides) demonstrated significant pathological changes across neural tissues, characterized by neuronal degeneration, vacuolation, gliosis, and vascular disruption. Among single-pesticide exposures, FIP caused the most severe neurotoxic effects, followed by DM and IMI, indicating distinct neurotoxicity profiles. Notably, subchapter 5.4 (Brain histopathological assessment of zebrafish subchronically exposed to combined pesticides) revealed substantially amplified neuropathological responses in binary and ternary pesticide exposure scenarios, underscoring a pronounced synergistic toxicity effect.

The behavioral implications described in subchapter 5.5 (Behavioral assessment of zebrafish following subchronic pesticide exposure) further confirm significant neurotoxic effects, revealing substantial impairments in standard locomotor patterns and heightened anxiety behaviors. Such behavioral disruptions were markedly intensified in groups exposed to pesticide combinations, emphasizing the compounded neurological risk from multiple simultaneous exposures.

Molecular analyses presented in subchapter 5.6 (NTs and their receptors upregulated/downregulated gene expression) provided a detailed account of

disruptions within neurotrophic signaling pathways. Quantitative PCR and spatial in situ hybridization studies revealed a marked downregulation of key signaling pathways, including BDNF-TrkB and NGF-TrkA, which strongly correlated with the observed behavioral and histopathological changes. Conversely, NT-3-TrkC and NT-4/5-TrkB pathways displayed more moderate, yet significant, vulnerability, suggesting differential susceptibility among neurotrophic signaling axes.

In Chapter 6 (Discussions), subchapter 6.1 (Alterations in neurotrophin signaling pathways across treatments) provides a comprehensive comparison of the findings against existing scientific literature, discussing possible mechanisms underlying observed neurotrophin alterations. Subchapter 6.2 (Compensatory vs. decompensatory neurotrophic responses) explored adaptive versus maladaptive neuronal responses to neurotrophin disruptions, critically evaluating potential mechanisms of resilience and vulnerability within neural circuits.

Subchapter 6.3 (Linking molecular signatures to histopathological and behavioral changes) synthesized integrative perspectives, demonstrating how molecular-level disruptions directly corresponded with the severity of histopathological and behavioral outcomes, thereby validating the coherence and robustness of observed results. Subchapter 6.4 (Comparison with existing literature and contextualization) systematically places these novel findings within broader scientific and toxicological contexts, highlighting their significant implications for regulatory toxicology and environmental health sciences.

Chapter 7 (Conclusions) integrated and contextualized the comprehensive findings, emphasizing their considerable implications for ecological health and public safety. The demonstrated heightened risk associated with pesticide mixtures warrants a reevaluation of existing regulatory safety assessments. Furthermore, the study strongly encourages subsequent translational research using mammalian models to enhance the applicability and generalizability of findings. Ultimately, this research significantly advances understanding of pesticide-induced neurotoxicity mechanisms, strongly advocating for proactive environmental and health management strategies.

REZUMAT

Teza de doctorat, având titlul " OBSERVAȚII PRIVIND DISTRIBUȚIA NEUROTROFINELOR ȘI A RECEPTORILOR SPECIFICI ÎN SISTEMUL NERVOS LA PEȘTELE ZEBRĂ (*DANIO RERIO*) ADULT ȘI DINAMICA ACESTORA SUB INFLUENȚA UNOR PESTICIDE" a fost realizată în conformitate cu metodologia de redactare a unei teze de doctorat, cuprinzând două părți: cea dintâi sumarizează stadiul actual al cercetărilor pe tema de doctorat prin studierea literaturii de specialitate din domeniul tezei, urmată de partea a doua, unde sunt relatate rezultatele obținute în urma cercetărilor proprii asupra temei abordate.

Pentru redactarea tezei au fost consultate 571 de surse bibliografice din literatura de specialitate națională și internațională, iar datele prezentate au fost susținute de 95 figuri și 6 tabele.

Prima parte a tezei cuprinde trei capitole: un capitol ce descrie biologia și habitatul natural al peștelui-zebră, precum și aplicațiile acestuia în cercetare; un capitol ce descrie la nivel molecular neurotrofinele și receptorii specifici; precum și un capitol în care se tratează considerații generale privind pesticidele.

Neurotrofinele (NT), inclusiv factorul de creștere nervoasă (NGF), factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) și neurotrofina-4/5 (NT-4/5), împreună cu receptorii lor specifici (TrkA, TrkB, TrkC și p75NTR), joacă roluri esențiale în supraviețuirea, dezvoltarea, plasticitatea și funcționarea neuronală. Așa cum este detaliat în Capitolul 2 (Neurotrofine), aceste molecule sunt fundamentale în modularea circuitelor neuronale și menținerea integrității cerebrale. Dereglările sau dezechilibrele căilor de semnalizare neurotrofinice sunt asociate cu numeroase afecțiuni neurologice și neurodegenerative, evidențiind necesitatea unor studii aprofundate asupra reglementării acestora, în special sub stresori precum toxinele din mediu.

Peștii-zebră (*Danio rerio*) au devenit un model puternic pentru investigarea mecanismelor neurotoxice datorită similitudinii genetice, fiziologice și de dezvoltare cu oamenii, așa cum este descris în detaliu în Capitolul 1 (Peștele-zebră ca organism model). Transparența embrionară, ciclul rapid de viață și delimitarea anatomică clară oferă avantaje distincte pentru intervenții experimentale precise și analize observaționale detaliate.

Utilizarea larg răspândită a pesticidelor precum deltametrina (DM), imidaclopridul (IMI) și fipronilul (FIP), documentată exhaustiv în Capitolul 3 (Pesticide), generează îngrijorări semnificative privind posibilele lor efecte neurologice adverse. Deși profilele de toxicitate ale

pesticidelor individuale sunt relativ cunoscute, expunerile combinate sau mixte reprezintă o lacună semnificativă de cunoaștere.

Prezenta cercetare, descrisă sistematic în Capitolul 4 (Design experimental), și-a propus să investigheze modul în care expunerea cronică și subcronică la aceste pesticide, individual și în combinație, influențează distribuția și dinamica expresiei neurotrofinelor și receptorilor lor în creierul peștilor-zebră adulți.

Caracterizările anatomice și histologice de bază au fost stabilite inițial în subcapitolul 5.1 (Anatomia și histologia creierului peștelui-zebră adult), oferind puncte de referință esențiale pentru interpretarea modificărilor patologice observate. Mai mult, expresia și localizarea anatomică inițială a neurotrofinelor și receptorilor acestora în creierul și retina peștelui-zebră au fost documentate meticulos prin metode avansate de hibridizare in situ, descrise în subcapitolul 5.2.

Rezultatele experimentale sunt documentate sistematic în Capitolul 5. Subcapitolul 5.3 (Evaluarea histopatologică a creierului peștilor expuși subcronic la pesticide individuale) a demonstrat modificări patologice semnificative în țesuturile neuronale, caracterizate prin degenerare neuronală, vacuolizare, glioză și deteriorare vasculară.

Printre expunerile individuale, FIP a cauzat cele mai severe efecte neurotoxice, urmat de DM și IMI, indicând profiluri distincte de neurotoxicitate. Notabil, subcapitolul 5.4 (Evaluarea histopatologică a creierului peștilor expuși subcronic la combinații de pesticide) a relevat amplificări substanțiale ale răspunsurilor neuropatologice în scenarii de expunere binară și ternară, subliniind efecte sinergice pronunțate.

Implicațiile comportamentale descrise în subcapitolul 5.5 (Evaluarea comportamentului peștilor după expunerea subcronică la pesticide) au confirmat efecte neurotoxice semnificative, evidențiind perturbări substanțiale ale comportamentului locomotor și accentuarea anxietății. Aceste tulburări comportamentale au fost intensificate semnificativ la grupurile expuse la combinații de pesticide, subliniind riscul neurologic amplificat generat de expunerile multiple simultane.

Analizele moleculare prezentate în subcapitolul 5.6 (Expresia genelor neurotrofinelor și receptorilor acestora, supra- sau sub-regulate) au oferit o descriere detaliată a perturbărilor din căile de semnalizare neurotrofinice. Studiile PCR cantitative și de hibridizare in situ au relevat o subreglare marcantă a axelor-cheie, inclusiv BDNF-TrkB și NGF-TrkA, corelate puternic cu modificările comportamentale și histopatologice observate. În schimb, căile NT-3-TrkC și NT-4/5-TrkB au arătat o vulnerabilitate moderată, sugerând susceptibilități diferențiate printre axele neurotrofinice.

În Capitolul 6 (Discuții), subcapitolul 6.1 (Modificări ale căilor neurotrofinice între tratamente) a furnizat o comparație amplă a constatărilor cu literatura științifică existentă. Subcapitolul 6.2 (Răspunsuri neurotrofice compensatorii vs. decompensatorii) a explorat răspunsurile neuronale adaptative versus maladaptative la perturbările neurotrofinice.

Subcapitolul 6.3 (Legături între semnalele moleculare, modificările histopatologice și comportamentale) a sintetizat perspective integrative, demonstrând coerența și robustețea rezultatelor observate. Subcapitolul 6.4 (Comparație cu literatura existentă și contextualizare) a

plasat sistematic aceste constatări în contextul mai larg al toxicologiei de reglementare și sănătății mediului.

Capitolul 7 (Concluzii) a integrat și contextualizat constatările comprehensive, subliniind implicațiile semnificative pentru sănătatea ecologică și siguranța publică.